

BF

[19]中华人民共和国专利局



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97190052.3

[51] Int. Cl.<sup>6</sup>

A61K 9/08

A61K 9/10

[43] 公开日 1998 年 4 月 8 日

[11] 公开号 CN 1178460A

[22] 申请日 97.1.31

[30] 优先权

[32] 96.1.31 [33] EP[31] 96200190.5

[32] 96.3.8 [33] EP[31] 96200594.8

[32] 96.6.21 [33] EP[31] 96201713.3

[32] 96.10.3 [33] EP[31] 96202781.9

[86] 国际申请 PCT/EP97/00507 97.1.31

[87] 国际公布 WO97/27841 英 97.8.7

[85] 进入国家阶段日期 97.9.30

[71] 申请人 吉斯特·布罗卡迪斯股份有限公司

地址 荷兰代尔夫特

[72] 发明人 L·爱德斯 H·S·谭

J·W·J·拉比尔斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标  
事务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 含有稳定生物有效化合物的组合物的应用

[57] 摘要

本发明描述了一种配制系统，它能够应用一种被适当稳定化了的含有生物有效化合物的含水组合物。使用一个两室配制系统，其中分别盛有含有生物有效化合物的稳定化了的组合物以及一种含水基础组合物。从配制系统中同时输送两种组合物，随后将组合物混合以产生一种适于直接应用的最终组合物。

(BJ)第 1456 号

## 权 利 要 求 书

1. 一种分别装有第一和第二含水组合物的配制系统，  
所说第一组合物是一种含有生物有效化合物的组合物，所说生物有效化合物是被稳定配制的，在通过配制而混合时，第一和第二组合物产生一种最终组合物，而且所说最终组合物对于以一种活性形式使用所说的生物有效化合物是有效的。
2. 权利要求 1 的配制系统，其中第一和第二组合物以从 1:1 变化到 1:50 的比率配制，优选的比率是从 1:2 变化到 1:20，更优选的比率是从 1:5 变化到 1:10。
3. 权利要求 1 或 2 的配制系统，其中第二组合物含有一种附加的活性成分。
4. 权利要求 1—3 中任一项的配制系统，其中第一组合物附加地含有一种增粘剂。
5. 权利要求 1—4 中任一项的配制系统，其中生物有效化合物被以一种颗粒的形式配制。
6. 权利要求 5 的配制系统，其中的颗粒是一种晶体。
7. 权利要求 5 或 6 的配制系统，其中第一组合物附加地含有一种增粘剂，它在含水组合物中形成一种三维网络。
8. 权利要求 1—4 中任一项的配制系统，其中生物有效化合物是一种酶。
9. 权利要求 8 的配制系统，其中酶以一种颗粒形式配制。
10. 权利要求 9 的配制系统，其中所说颗粒形式是通过将酶固定化在固体载体上获得的。
11. 权利要求 9 的配制系统，其中所说颗粒形式是通过酶的结晶获得的。
12. 权利要求 9—11 中任一项的配制系统，其中所说第一组合物附加地含有一种增粘剂，它在含水组合物中形成一种三维网络。
13. 权利要求 8—12 中任一项的配制系统，其中第二组合物含有一种

- 对应于第一组合物中的酶的前活化底物。
14. 权利要求 13 中的配制系统, 其中前活化底物是一种维生素前体。
  15. 权利要求 8—14 中任一项的配制系统, 其中酶组合物被使用一种高浓度的多元醇稳定地配制。
  16. 权利要求 15 的配制系统, 其中多元醇以 20—90% 的浓度使用, 优选的浓度为 30—90%, 更优选的浓度为 40—90%, 更加优选的浓度为 50—90%, 最优选的浓度为 60—80%。
  17. 权利要求 8—16 中任一项的配制系统, 其中的酶是蛋白酶。
  18. 权利要求 8—16 中任一项的配制系统, 其中的酶是一种优先选择短链脂酰基的酯酶, 优选是少于 10 个碳原子的短链脂酰基。
  19. 权利要求 8—16 中任一项的配制系统, 其中的酶是磷酸酶。
  20. 权利要求 19 的配制系统, 其中的磷酸酶是肌醇六磷酸酶。
  21. 权利要求 1—7 中任一项的配制系统, 其中生物有效化合物是一种多烯大环内酯抗生素。
  22. 权利要求 21 的配制系统, 其中的多烯大环内酯抗生素是那他霉素。
  23. 权利要求 1—7 中任一项的配制系统, 其中的生物有效化合物是二羟基丙酮。
  24. 一种用物理法稳定含有生物有效化合物的组合物的方法, 所说生物有效化合物以一种颗粒形式配制, 其中向组合物中加入一种增粘剂, 它在含水组合物中形成一种三维网络。
  25. 一种含有生物有效化合物的含水组合物, 所说生物有效化合物被稳定配制, 它被用于权利要求 1—23 中任一项的配制系统。
  26. 权利要求 1—23 中任一项的配制系统在局部使用生物有效化合物中的应用。

# 说明书

## 含有稳定生物有效化合物的组合物的应用

本发明涉及的领域是通过使用一种多组分配制系统对含有稳定生物有效化合物的组合物的应用。

酶的局部应用在化妆品和制药领域已有描述。例如,蛋白酶的使用被认为维持或替代了去皮剂中的 $\alpha$ -羟酸(日本专利申请号J04027388)。谷胱甘肽巯基氧化酶被认为可用于发型固定中(日本专利申请号J04005220)。另外,国际专利申请WO93/19731中描述了使用糖苷酶以改善去皮步骤并提到了溶菌酶在处理痤疮中的应用(HUT 057608)。最近公开了许多使用转谷氨酰胺酶的专利申请(WO94/18945, J02204407)。

然而,在液体含水组合物中的酶的有限的存储稳定性被认为是对于这些酶进行广泛应用的主要限制因素。

含酶的商品试剂通常利用酶在干燥状态下的存储稳定性。根据这一构思,销售含酶产品的最简单的办法是将酶与产品分开输送,比如将酶压成合适的片状。在另外的方法中,可将干燥的酶粉末均匀地分散于一种基本上无水的疏水基料中,例如一种与油脂胶凝剂组合的合适的油脂。

第一种方法的缺点是在含水组合物中所需进行的酶片剂的溶解是缓慢的和不方便的。考虑第二种方法,应该提到的是酶需要水来活化。为了提高效率,水相和油相的混合通常需要相对较高的能量输入而不能通过简单的手工混合来完成。因此,含水组合物与含酶的疏水相的混合被认为是效率很低的。

在实际应用中可以通过使用用于局部应用的在水相中稳定的酶组合物来避免上述问题的发生。不幸的是,含水酶组合物中需要高浓度的可溶于水的稳定剂以降低组合物中的水活度。多元醇经常被用于这一目的,而且只有在多元醇的浓度刚好高于40%(V/V)时才能达到长期的稳定性。然而,在含有高浓度多元醇的组合物中,酶通

常不具有活力。尤其是对用这种方法稳定的酶组合物的直接应用将不能提供足够的水以使酶重新活化。另外,在组合物中这样高浓度的多元醇的存在在局部应用中被认为是不可接受的。

因此,在水环境中稳定酶所需的高多元醇浓度阻止了对用这种方法稳定的含水酶组合物的直接应用。

另一个能够有效地使用酶的领域是洗衣业中的手洗领域。尽管在欧洲与北美,与手洗相比人们更倾向于机洗,但是对于易损的织物来说手洗还是普遍的。对于具有易损织物的少数毛织品和丝织品,污渍的去除、防止织物起球、颜色的复原以及织物的收缩仍然存在着很大的问题。这类特殊的织物需要特殊的酶,例如在中性 pH 值附近和/或低温下具有活力的蛋白酶,或诸如蛋白质二硫键异构酶的硫桥重排酶,其作用是防止洗涤过程中对毛织品的损坏(EP276547)。这种使用范围狭窄的产品的缺点是它们显然不适于降低广泛使用的洗涤剂的成本或酶配方的开发。

同样地,除了酶之外,已知还有许多生物有效化合物在含水的最终组合物中是不稳定的,这些组合物适合于在特定用途中的直接应用。通常,诸如酶、抗生素、维生素、多不饱和化合物以及类似的生物有效化合物在含水组合物中长期存储会失去它们的活性。尽管已知有特殊的配方,其中稳定地含有上述生物有效化合物,但目前的配方通常还不适于在所希望的用途中直接地使用。

本发明涉及一种配制系统,其中分别装有第一和第二含水组合物,第一组合物是一种含有被稳定配制的生物有效化合物的组合物,其中在通过配制而混合时,第一和第二组合物形成一种最终的组合物,而其中最终的组合物对于以活性形式应用上述生物有效化合物是有利的。

在本发明的配制系统中分别装有一种包含一种稳定生物有效化合物的含水组合物以及一种含水的基础组合物。使用该配制系统能够同时输送两种含水组合物。在输送过程中,两种组合物都被混合,导致了含有稳定生物有效化合物的组合物在基础组合物中的稀释,产生了一种适于直接应用的最终组合物。

用于本发明配制系统的优选的生物有效化合物是酶、维生素、多烯大环内酯抗生素、二羟基丙酮以及醛类香料。本发明的配制系统特别适于生物有效化合物的局部应用。

在本发明的配制系统中分别装有一种含有一种被稳定配制的生物有效化合物的含水组合物以及一种含水的基础组合物。

使用上述配制系统能够同时输送含有一种被稳定配制的生物有效化合物的含水组合物(在本发明中通称为“有效组合物”或“第一组合物”)以及含水的基础组合物(也被称作“第二组合物”)。在输送过程中,或者在原位、或者在配制系统中,两种组合物都被混合。两种组合物的混合形成了一种最终组合物,其中含有处于活性状态的生物有效化合物,它还适于直接的使用。

术语“基础组合物”是指一种与含有生物有效化合物的含水组合物组合时产生一种最终组合物的组合物,该最终组合物适于对生物有效化合物的直接应用。基础组合物的性质将主要取决于所希望的用途。已知含水基础组合物中含有水包油乳化剂。

优选地,含水基础组合物是一种适用于局部、洗涤剂或清洁用途的组合物。更优选地,含水基础组合物是一种适用于局部应用的组合物。最优选地,含水基础组合物是一种适用于化妆品的组合物。

含水基础组合物可以是一种膏状物、一种凝胶、一种香波、一种清洁液、一种洗液、一种液体洗涤剂、一种硬表面清洁组合物以及类似的物质。

适合于在本发明的配制器中使用的生物有效化合物是那些能够显示生物活性而且在含水的最终组合物中不稳定的化合物,在该最终组合物中应该可以应用这些生物有效化合物。另外,适合于在本发明的配制器中使用的生物有效化合物是那些为它们开发了稳定含水组合物的化合物,而该稳定组合物不适于在所希望的用途中直接使用。

适合于在本发明的配制器中使用的生物有效化合物就获得化合物的来源以及该化合物的性质来说是有分别的。

就生物有效化合物的来源来说,该化合物可从动物、植物以及微

生物来源中获得。优选地,该化合物从微生物或植物来源中获得。更优选地,该化合物从微生物来源中获得。

就生物有效化合物的性质来说,该化合物选自初级和次级代谢产物,优选是选自酶、抗生素、(多)不饱和化合物、维生素、香料、二羟基丙酮,更优选是选自酶、维生素、多烯大环内酯抗生素、醛类香料化合物以及二羟基丙酮。

在水存在的环境中生物有效化合物的不稳定性在长期存储后尤其明显,这可能是由于其化学性质引起的,例如由结构损坏(例如酶和其它蛋白质的变性)、氧化侵蚀以及诸如非最适 pH 值的其它不利条件而导致的不稳定。氧气、光以及来自微量铁或铜的金属离子的存在会对生物有效化合物产生有害的氧化作用,这些化合物包括维生素、类胡萝卜素、(多)不饱和油脂以及(多)不饱和脂肪酸(例如参见 CRC Handbook of Food Additives, second edition)。另外,在水存在的环境中微生物的生长或者含有生物有效化合物的含水组合物的物理不稳定性可能也是导致不稳定性产生的原因。

基于导致生物有效化合物不稳定的因素,开发了一种稳定的含水配方,举例来说,其特征在于下述的一个或几个条件:低的水活度、或低或高的 pH、高浓度的抗氧化剂、高浓度的多价螯合剂、高浓度的抗微生物剂、生物有效化合物的结晶以及高浓度的增粘剂。通常,在含水组合物中稳定生物有效化合物所需的上述条件不允许直接使用上述含水组合物。

本发明的配制系统能够使用较高浓度的化学稳定剂以得到原本不稳定的生物有效化合物的稳定组合物,即该浓度可以比最终组合物中允许的浓度高很多,原因是配制时稳定剂被含水的基础组合物稀释。合适的稳定剂包括诸如盐类或多元醇的水活度降低剂、诸如 EDTA 的多价螯合剂、肌醇六磷酸盐或葡糖酸盐或诸如亚硫酸盐的抗氧化剂、谷胱甘肽、半胱氨酸或抗坏血酸。

在本发明的另一方面,配制系统的使用保证了在基础组合物中稀释了有效组合物后,生物有效化合物能够达到有效的浓度。因此,生物有效化合物可以以一种比所需要的有效浓度更高的浓度存在于

有效组合物中。在这样的高浓度下,许多生物有效化合物在含水组合物中是不溶的。这意味着生物有效化合物可以以晶体形式存在。这种晶体形式对于保证化合物的稳定性是十分有利的。

然而,对于包含有结晶化合物的组合物来说,一个重要的问题是在该组合物中结晶易于沉淀,也就是说这种组合物在物理上是不稳定的。

本发明揭示了通过使用合适的增粘剂可以防止结晶化合物的沉淀。所述增粘剂最好能在含水环境中形成一种三维网络。更优选该增粘剂选自合成生物聚合胶(xanthan)、Carbopol<sup>®</sup>或相关的树脂或者角叉胶。最优选地,该增粘剂是合成生物聚合胶。合适的增粘剂的浓度主要取决于维持在悬浮液中的颗粒的重量和大小。合适的浓度范围为0.1-3%,优选为0.2-0.6%。

本发明的配制系统能够通过与其基础组合物一起分散来稀释存在于含有生物有效化合物的组合物中的稳定剂。本发明的配制系统还能够将有效组合物稀释至有效的浓度。

含有生物有效化合物的组合物(有效组合物)在基础组合物中的稀释倍数被合适地选择,即在这种情况下稳定剂的最终浓度不会妨碍最终组合物的使用,而且此时生物有效化合物以其合适的有效浓度存在于最终组合物中。稀释倍数取决于配制系统所输送的有效组合物和基础组合物的比率。优选地,有效组合物和基础组合物的比率从1:1变化为1:50,更优选是从1:2到1:20,最优选的比率是1:5到1:10。

根据本发明,有效组合物的粘度值优选与基础组合物的粘度相类似,其中基础组合物与含有生物有效化合物的组合物同时使用。例如,两种组合物都可具有洗液状的、膏状的或凝胶状的粘稠度。另外,有效组合物的粘度将取决于用于输送组合物的配制系统的类型。例如,管的使用需要两种组合物的相对较高的浓度。

将要加入到有效组合物中的增粘剂的量将取决于所希望的该组合物的粘度。本领域的技术人员已知的任何增粘剂,只要它适用于最终组合物以及所希望的用途,就可以使用。例如,对于局部应用来



说就要考虑其对于局部应用的可接受性。增粘剂的例子包括角叉胶、织物素衍生物、聚丙烯酸、粘土、聚乙二醇、诸如合成生物聚合胶的氢化胶体。

如果需要的话,可以将某些试剂加入到有效组合物和/或基础组合物中,这样两种组合物就可具有相同或不同的外观。这种试剂的典型例子是染色剂。

已知含水的有效组合物中包含水包油乳化剂。

为获得易于氧化的含有生物有效化合物的组合物的理想的存储稳定性,氧气的透过性很低的非半透明(non-translucent)的包装材料将是理想的。本发明的配制系统提供了这样一种可能,即将含有生物有效化合物的组合物填充在由即使在高湿度下也具有极低的氧气透过率的非半透明材料制成的小室中,其目的是使光的作用和氧气的侵入减至最小。优选的包装材料包括 PVdC、EVOH 和 砷土涂覆的聚合物(参见 Food Manufacture, June 1991, pp 49-53)。如果在大容量的配制器中使用,另外的要求是使用一台无空气的洗液泵来配制生物有效化合物。

将要在本发明的方法中使用的配制系统对于本发明来说不是关键的。本发明考虑了任何能够分别容纳稳定的有效组合物和基础组合物的系统。分别的容纳被认为包括任何形式的隔离方式,它能够阻止水从一种组合物向另一种组合物的显著的扩散。

例如,一种配制系统可从多组分配制系统中选出,它被开发用于包装和输送不相容化学物质,即当接触时相互之间发生化学反应的化学物质。例如,多组分配制器已知是来自粘合剂领域。多组分粘合剂的包装需要树脂与固化剂完全分开。还有就是方便的使用方法要求同时输送两种组分。

除了粘合剂外,多组分配制系统还在牙膏的不相容化合物的配制中得到了描述。具有两个小室的软管牙膏描述于美国专利 US4,487,757、US4,098,435 和 US4,211,341 中。后者公开了对诸如在多元醇溶液中的羧甲基织物素凝胶的可挤压物质的使用,其目的是分隔不相容的化合物。一种把无水的酶组合物与含水的牙膏组合物

分隔存储的具有两个小室的管被描述于 FR2,051,922。

在另一个极为简单的方法中,一对塑料袋只能提供单独使用的物质。两个袋的出口彼此之间很近,其内容物的排出可以通过撕开袋的末端完成(德国专利申请 DE3,630,849)。

本发明还考虑了在分隔的容器中配制和存储稳定的有效组合物和基础组合物,分隔的容器被置于一一起和/或由使用者提供一个合适的配制器。也可能的情况是已经提供了盛有一种组合物(例如稳定的有效组合物)的容器的配制系统又另外提供了盛有其它组合物(例如基础组合物)的容器。

本发明的配制系统可被方便地用于任何用途,在该用途中,生物有效化合物的不稳定作用是所期望的。本发明的配制系统特别地提供了一种用于所感兴趣的生物有效化合物的局部应用的方便和简单的方法。已知的局部应用包括在皮肤和毛发上的应用以及在口腔中的应用,例如在牙齿上的应用。

现在借助一些生物有效化合物来阐述本发明的配制系统的适用性。

### 酶

通常,用高浓度的水活度降低剂—诸如多元醇或盐类—来稳定含水的酶组合物,最好用多元醇来稳定。

使用本发明的配制器,酶和基础组合物的混合导致了酶组合物在基础组合物中的实际上的稀释。在酶组合物中诸如多元醇的高浓度物质保证了稀释后酶的活力,即使酶组合物经过了长时间的存储也是如此。

上述的酶组合物的稀释导致了多元醇的稀释,从而又导致了酶被重新激活。根据所使用的酶和多元醇,可以预计酶的重新激活在多元醇浓度低于 40% w/w 时开始。

由配制系统所输送的酶组合物和基础组合物的比率取决于诸如酶组合物中的多元醇浓度等因素,该比率应调节至能够保证酶的重新激活。另外,如果希望进行局部使用,上述比率应按如下方式调节,即在将酶与基础组合物混合后,多元醇的浓度水平不超过用于局

部配方的可接受的水平。

使用本发明的配制系统能对任何感兴趣的酶进行稳定配制和应用。优选地,感兴趣的酶从下组酶中选出:氧化还原酶、转移酶、水解酶或异构酶。更优选地,该酶是葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、脂肪合酶、超氧化物歧化酶、酪氨酸酶、蛋白酶、磷酸酶、肌醇六磷酸酶、糖苷酶、变位酶( $\alpha$ -1,3-葡聚糖酶)、葡聚糖酶、溶菌酶、脂肪酶、磷脂酶、硫酸酯酶、脲酶、转谷氨酰胺酶或蛋白质二硫键异构酶。也可以使用含有两种或多种酶的混合物的稳定的组合物。

在酶组合物中酶的浓度主要取决于其用途的类型。

本发明还考虑了酶以颗粒形式配制的酶组合物。以颗粒形式配制的酶大大减小了产生致敏作用的危险,致敏作用可能是由于使用完干燥后的酶分子的潜在吸入物而产生。优选地,以颗粒形式配制的酶的颗粒大小至少为约5-10 $\mu$ m。酶颗粒大小的上限的主要决定因素是较大的颗粒将具有不利的表面载荷而且在用于皮肤时会产生一种砂砾状的感觉。颗粒大小的上限通常为大约100 $\mu$ m。

获得大小至少为约5-10 $\mu$ m的酶颗粒的一种方法是将酶共价固定化在合适的载体上,参见 Method in Enzymology, vol. 44 (1976)中描述的方法。另一个合适的颗粒形式的例子是所谓的 ChiroCLEC (Altus Biologics Inc., Cambridge, MA, USA),它包含交联的酶晶粒。这些交联的酶颗粒不需要诸如多元醇的稳定配方用的水活度降低剂的存在;由于它们的晶体形式,它们在含水组合物中是化学稳定的。但是还需要加入水活度降低剂以改进含水组合物的微生物稳定性。

对用来稳定酶组合物的多元醇的选择对于本发明来说不是十分关键的。本领域的技术人员已知的能够在水溶液中有效地稳定酶的任何多元醇都可以使用。十分有效的多元醇从下组多元醇中选出:甘油、山梨醇、丙二醇、麦芽糖糊精,或者从下组糖中选出:蔗糖、乳糖、葡萄糖或海藻糖。为了局部应用,应该考虑一种在局部使用时可接受的多元醇,即甘油、聚乙二醇、丁二醇、丙二醇、海藻糖或山梨醇。

在高浓度下使用多元醇,即该浓度能够使酶组合物有足够低的

水活力以恰当地稳定酶。在本技术领域内已知这些浓度将随所使用的多元醇而有某些改变。优选地,多元醇在 20—90% 的浓度下使用,更优选的浓度是 30—90%,再优选一点的浓度是 40—90%,再优选一点的浓度是 50—90%,最优选的浓度是 60—80%。

在含水组合物中较低的水活度对防止组合物中微生物的生长也是有利的。

除了多元醇外,诸如 NaCl 的盐类也可被用于在产品的存储过程中促进酶的稳定性。为进一步提高酶的稳定性,可以加入低浓度的酶稳定剂,例如还原剂、钙盐或底物或与底物有关的配体(Gray, 1993, *Thermostab. Enzymes*, pp. 124—143. Narosa, New Delhi)。

可选择性地向酶组合物中加入增粘剂,尤其是当加入多元醇或其它有关组分后酶组合物的浓度不如希望的高时。将要加入到酶组合物中的增粘剂的量取决于被用于稳定酶组合物的多元醇的增粘特性以及所希望的酶组合物的粘度。

如果使用固定化的或结晶的酶制剂,酶组合物的粘度应该能防止酶颗粒的沉淀。优选地,如上所述,所使用的增粘剂应该能够在含水组合物中形成一种三维的网络。

根据本发明,酶组合物将与适当的含水基础组合物被基本上同时输送。对于本发明来说,含水基础组合物的性质不是很重要,它将主要取决于所希望的用途的类型。

还应注意避免含水基础组合物中含有能够使酶在瞬间失活的组分。对化妆品洗液来说,一种能够使酶失活的组分的典型例子是高浓度的乙醇。

本发明的配制系统可被方便地用于任何需要酶作用的用途中。本发明的配制系统尤其提供了一种对所感兴趣的酶进行局部应用的方便和简单的方法。局部用于本发明的配制器中的优选的酶是蛋白酶。

本发明的配制系统还适于同时输送一种酶组合物和一种含有前活化底物的第二组合物,这样,在两种组合物的输送和混合时,酶将前活化底物转化为一种活性组分。当在特定的组合物中活性组分不

稳定而且存在配制更稳定的活性组分的前体即所谓的前活化底物的可能性时,本发明的这一实施方案是优选的。

例如,乙酸维生素 E、乙酸维生素 A 以及棕榈酸维生素 A 是把这些不稳定但又需要的维生素施用于皮肤时通常使用的前体分子。由于皮肤中或皮肤上的酶活力,部分前体被认为慢慢地转化成为活性化合物(例如参见:Boehnlein et al., *Pharmaceutical Research* Vol. II, no. 8 (1994), 1155-1159)。按照本发明的配制方法,将这些存储稳定的前体与适当的水解酶相结合,活性的视黄醇或生育酚就能够释放到皮肤上。使用本发明的配制系统的一个重要的优点是,与依靠存在于皮肤中的相关酶的情况相比,前体分子的水解率明显地增高。在某些应用中,例如在防晒用途中,维生素 A 立即就能释放至合适的浓度的优点是十分明显的(例如参见 Beijersbergen van Henegouwen et al, *Fat Sc. Technol.* 94(1992), 24-27)。

为了激活或者维生素 A 或者维生素 E 的棕榈酸衍生物,使用一种合适的脂肪酶是一种明显的选择。可以预计许多商品脂肪分解酶能够将这些前体分子水解为活化的维生素和棕榈酸。然而,在化妆品应用中使用脂肪酶有一些严重的缺点,其中包括存在于化妆品组合物中的油脂的破坏以及存在于人皮肤中的相当部分的保护性脂类化合物的降解(*Cosmetics & Toiletries* 102 (1987), 36-42)。为避免这种不利情况的发生,使用各种维生素的乙酸衍生物而不是棕榈酸衍生物将是有利的,这样就可以使用能够选择性地除去维生素前体中的乙酸部分而不破坏皮脂的酶。

例如,某些酯酶/脂酶优先选择短链的脂酰基(2-10 个碳原子)而不能水解更长一些的脂酰基( $\geq 16$  个碳原子)。举例来说,这些酯酶可从 Recombinant Biocatalysis Inc. (Philadelphia, USA) 购得。另外,木聚糖乙酰酯酶(cf. EP507369)和鼠李半乳糖乙酰酯酶(cf. WO 93/20190)对植物细胞壁组分是有活力的,而且不大可能水解存在于人皮肤中的脂类。除了这类酶外,酯酶活力也被认为是由某种丝氨酸蛋白酶造成的。在本发明中使用合适的丝氨酸蛋白酶是有利的,因为它能够将去皮作用与所选的维生素前体的快速转化结合起来。

另一种维生素抗坏血酸被认为在化妆品中是有好处的,原因是它对人皮肤中黑素形成的抑制作用、对胶原蛋白形成的刺激作用以及它的抗氧化剂活力。遗憾的是,由于抗坏血酸的不稳定性,它不能被应用于任何化妆品。因此,磷酸抗坏血酸镁,一种稳定的和可溶于水的抗坏血酸衍生物,被许多公司开发和商品化。由于在皮肤上存在磷酸酯酶(fosfatase),磷酸抗坏血酸镁可在原处被转化为有活力但不稳定的抗坏血酸。遗憾的是,自然产生于皮肤上的磷酸酯酶的活力相当低(Mima et al. Vitamins 41 (1970), 387)。本发明的配制系统能够将磷酸抗坏血酸与合适的磷酸酶组合起来以保证在皮肤上快速形成抗坏血酸。肌醇六磷酸酶催化磷酸从肌醇六磷酸酯中的释放,尤其是来自黑曲霉的肌醇六磷酸酶显示出是用于这一方面的十分合适的磷酸酶。

与用原位除去衍生物中的稳定部分来激活前活化维生素衍生物的方法十分类似,可对其它类型的前体分子进行酶修饰。已知许多糖基化的天然色素包括花青素苷和食品级的胭脂红。按照 Blom 的描述(Food Chemistry 12 (1983), 197-204),  $\beta$ -葡糖苷酶和红色花青素苷颜料的组合产生了一种不溶于水的、有颜色的糖苷配基。使用本发明的配制系统,通过含有稳定的  $\beta$ -葡糖苷酶的组合物与含有红色花青素苷的合适的化妆品组合物的配制与混合形成了糖苷配基。由于其疏水性的增加,糖苷配基将更加紧密地附着在诸如皮肤和毛发的疏水表面,因而不能够用水将它从表面上有效地除去。

其它酶法的目的是使用本发明的配制系统产生可反应的染色剂以用于毛发的氧化染色。为达到这一目的,将稳定化的漆酶组合物与含有染色剂前体的合适的组合物相组合,后者的例子为单或多酚化合物(例如参见 FR2, 694, 018; EP 504005)。

本发明的配制系统还被方便地用于原位的过氧化物酶催化形成杀菌化合物。将稳定的过氧化物酶与合适的前体分子——可选择性地加入清洁剂——分别盛放,这在应用特定的具有有限时间的细菌活力的杀菌剂时是重要的(cf. US4, 476, 108, US4, 588, 586)。这些自然形成的杀生物化合物的典型的例子是次卤酸,它由卤过氧化物

酶催化过氧化氢加卤化物制得;以及次硫氰酸,它由乳过氧化物酶催化过氧化氢加硫氰酸制得。在所有情况下,过氧化氢都是一种十分重要但相当不稳定的前体。

在本发明的配制系统中,通过使用诸如锡酸钠或膦酸(例如 Dequest 2010)的稳定剂,过氧化氢溶液可被稳定地加入到第二含水组合物中。这些稳定剂优选与合适的诸如 Carbopol 934 或 Rheovis CRXCA (Allied Colloids)的增粘剂组合使用。在该法中,第一组合物含有稳定的酶以及任何与过氧化氢不相容的化学物质。

本发明的配制系统还可以通过过氧化氢生成酶(例如一种乙醇氧化酶)原位酶法生成过氧化氢。上述过氧化氢生成酶与过氧化物酶包含在同样的组合物中。这种可选择性地与清洁相组合的温和的消毒形式不仅可以用于局部应用领域中以治疗各种形式的湿疹或痤疮,还可以用于诸如隐形眼镜的清洗以及家庭硬质表面清洁剂等的用途中。

使用本发明的配制器的另一个实施例是脂过氧化物的原位生成。为达到这一目的,将稳定的脂氧合酶组合物与含有亚油酸的组合物分别存放并通过配制来混合。也可以将脂氧合酶与亚油酸配制在一种组合物中,原因是被用于稳定酶的高浓度的多元醇还确保了酶的失活。原位产生的脂过氧化物适合于局部应用,例如用于脱毛或抑制毛发的生长(Puig Muset et al., Arzneimittel & Forschung, 10(1960), 234-239)。

还可以将含有酶的第一组合物与含有附加的活性成分的第二组合物组合起来,这样,附加的活性成分在上述用途中也显示出理想的活性。例如,在酶和附加的活性成分之间存在最佳协同作用。

在一个与局部应用完全不同的用途中,例如在面包制作中,配制器被用于将诸如淀粉酶、半织物素酶、蛋白质二硫键异构酶、脂氧合酶以及其它氧化还原酶这些发酵酶与液体面包改良剂中的附加组分相组合,这样,合适的酶底物存在于生面团中。

能够产生最佳协同作用的组合的例子是将蛋白酶与一种角质蛋白分解剂—例如一种  $\alpha$ -羟酸—相组合。所谓的果酸( $\alpha$ -羟酸或

AHA's)在化妆品工业中被用作能够引起皮肤脱落的试剂,从而产生了抗衰老的效果。其缺点是高的细胞更新速率所需的低 pH 值通常伴有过敏现象(参见 Smith, W.P., Cosmetics & Toiletries Vol 109, pp41-48, 1994)。为减弱过敏现象,一种方案是或者降低 AHA 浓度或者升高化妆品组合物的 pH 值以及通过向组合物中加入蛋白水解酶以补偿减弱的皮肤脱落效果。

另一个实施例是在牙齿护理产品领域中。自从将氟化物加入牙膏中后,龋齿的发病率得以明显地降低,原因是氟化物增强了牙齿的珐琅层。结果是生长在牙斑中的突变链球菌(*Streptococcus mutans*)成为导致龋齿的一个剩余的主要因素。有效地除去突变链球菌只能通过溶解保护性的和不溶于水的多糖基质来实现,而突变链球菌正是通过这种基质附着在珐琅上(例如参见 Hamada and Slade, Microbiol. Rev. 44 (1980), 331-384)。按照 US4,438,093 中公开的内容,诸如变位酶和葡聚糖酶的酶类会防止和抑制牙斑的形成。因此,本发明的酶配制系统提供了一种方便的方法以将含有氟化物的牙膏与用多元醇稳定的降解多糖的酶组合物相组合。

除了局部用途外,本发明的配制系统还可被方便地用于其它用途。例如用于洗衣业中对易损织物(如毛织品)的手洗。在本发明的配制系统中,将一种简单的液体洗涤剂与稳定的酶组合物分别盛放,然后按照所需的比例同时配制。

#### 多烯抗生素

含有多烯大环内酯抗生素(例如那他霉素、制霉菌素、两性霉素-B)的稳定含水组合物的开发通常是困难的,因为这些抗生素在水溶液中极其不稳定。

对于用那他霉素处理真菌感染来说,需要使用具有较高增溶化的那他霉素浓度的那他霉素组合物,特别是因为真菌需要一个相对较高的最小抑制浓度。通常,那他霉素在诸如二甲基甲酰胺、DM-SO、甘油或丙二醇等有机溶剂或在或低或高 pH 下的含水组合物中都有相对较高的溶解度。为了获得具有高浓度增溶那他霉素的含水组合物,优选在酸性或碱性条件下对这种抗生素进行增溶。然而,在



这种情况下那他霉素的稳定性很差。因此,这种那他霉素制剂优选是在刚使用前配制。

例如,在荷兰专利申请 NL7613253 中,描述了将那他霉素与柠檬酸组合以处理受发癣菌感染的马和牛,此时用于处理的溶液必须在刚使用前制备,方法是向那他霉素和柠檬酸的固体混合物中加入适量的水。然而,那他霉素和柠檬酸的固体混合物十分容易吸湿,因而也只能在相当短的时间内保持稳定。

稳定的含水那他霉素组合物描述于欧洲专利申请 EP678241 中,其内容被并入本文作参考。公开于 EP678241 中的稳定的那他霉素组合物是在含水介质中的那他霉素晶体悬浮液,其中通过加入合适的增粘剂防止了晶体的沉淀。

稳定的那他霉素组合物,例如公开于 EP678241 中的组合物,可被方便地用于本发明的配制系统中。可以将稳定的那他霉素悬浮液与合适的基础组合物同时配制。当需要在最终的配方中有大量的增溶的那他霉素时,上述的合适的基础组合物优选是一种具有或低或高的 pH 值的组合物。

如果可以得到一个合适的那他霉素配方的话,人皮肤的真菌感染也是那他霉素处理的一个潜在目标。治疗这些感染的合适的那他霉素配方包括含有那他霉素与柠檬酸的组合的组合物。使用本发明的配制系统能够将稳定的含水那他霉素悬浮液与第二种含有柠檬酸的组合物相组合。

合适的基础(第二)组合物的另一个例子是一种去头皮屑香波。  
其它化合物

二羟基丙酮(DHA)是通过发酵产生的,它是化妆品中的活性组分,能够将人工鞣料传递到人皮肤中。很久以前就发现了 DHA 在水溶液中很不稳定,这种不稳定性导致了皮肤鞣制能力的丧失以及诸如甲醛和甲酸等皮肤刺激剂的形成。

稳定的 DHA 溶液是通过将 DHA 溶液的 pH 调节至较低的范围而得到的,优选的 pH 值为 3 以下。由于这种酸性 pH 值对于局部应用是不合适的,因此在本发明的配制系统中将局部应用的组合物(例

如一种化妆品的组合物)与含有 DHA 的酸性组合物共同使用将是有利的。稳定的酸性 DHA 组合物通过与大量经过良好缓冲的化妆品组合物的混合后被中和。

醛类香料化合物是最不稳定的香料化合物之一,尤其是在碱性的条件下。因此,在诸如洗液、液体肥皂和香波的碱性个人护理用品中如何稳定地加入诸如香叶醛、橙花醛和香茅醛的醛类香料就成为一个主要的问题。

本发明的配制系统方便地保证了含香料组合物与合适的化妆品组合物的分别盛放,从而可以将所需的香料化合物用于个人护理用品中。

图 1 显示了纯的和稀释的稳定含水蛋白酶组合物的蛋白水解活力。蛋白水解活力通过用凝胶覆盖的薄膜板上的透明斑来测量。

图 2 显示的是在 pH4 和 7 下,在  $\alpha$ -羟酸存在时不同蛋白酶的蛋白水解活力。

图 3 显示的是一台配制泵,其中两种组合物被分别存储。两种组合物被同时配制,而且可以在配制泵内混合或分别输送并当场混合。

### 实施例 1

#### 在含有不同种类多元醇的组合物中蛋白酶的存储稳定性

为了显示各种中性蛋白酶在不同种类的多元醇中的存储稳定性,将不同来源的部分纯化的蛋白酶溶于含有 70% (w/w) 的丁二醇、丙二醇或 PEG6000 的液体中并在 5°C、25°C 或 40°C 下存储。在缓冲水溶液中稀释后,在不同的时间间隔测定剩余的酶活力。

#### 所使用的酶

来自地衣型芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的丝氨酸蛋白酶粉末购自 Genencor International, Brugges, Belgium。

非标准化的中性蛋白酶[来自液化淀粉杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的金属蛋白酶]购自 Gist-brocades, Séclin, France。

含有丝氨酸蛋白酶或中性蛋白酶的稳定的酶组合物是通过将所需数量的酶粉末溶于 70% (w/w) 的丁二醇(1,3-丁二醇;BG)、丙二

醇(1,2—丙二醇;BG)或 PEG 6000(聚乙二醇 6000;PEG)而制备的。为了最大的酶稳定性,以 0.1% 的浓度向每种溶液中加入 pH6.0 的醋酸钙。通过离心将任何所产生的沉淀除去,然后将各种稳定的酶溶液存储于 5℃、25℃ 或 40℃ 下。在不同的时间间隔取样并测定剩余的丝氨酸和中性蛋白酶活力。在蛋白酶测定中对含有多元醇的酶组合物的一千倍以上的稀释保证了不会有来自化学杂质的与蛋白酶无关的影响。

按照用于中性蛋白酶活力的 Gist-brocades 标准测定酶活力。该方法(ISL Method Number 61195)可要求 Gist-brocades Delft 提供。简而言之,该方法如下:

在 40℃、pH7.0 下向 0.3% 的 Hammersten 酪蛋白溶液中加入高度稀释的酶溶液。保温 60 分钟后通过加入 TCA 终止蛋白酶的活力。经充分混合并在 4℃ 下另外保温 30 分钟后,将样品离心。以蒸馏水为空白,在 275nm 的波长下测定上清液的吸光度。通过与标准蛋白酶样品比较就获得了最终的蛋白酶活力。

### 结论

——溶解于 70% 丁二醇或丙二醇中的丝氨酸蛋白酶比中性蛋白酶更稳定。

——在酶的稳定化方面,丁二醇和丙二醇明显地优于 PEG6000。

表 2. 丝氨酸蛋白酶

在下列条件下的剩余蛋白水解活力									
	5℃			25℃			40℃		
天数	BG	PG	PEG	BG	PG	PEG	BG	PG	PEG
1	9670	10050	9970	9670	10050	9970	9670	10050	9970
9	9590	9840	9980	9770	9940	8420	9460	9580	2530
22	9390	9600	9500	9088	9540	4620	9120	9440	2030

表 3. 中性蛋白酶

在下列条件下的剩余蛋白水解活力									
	5℃			25℃			40℃		
天数	BG	PG	PEG	BG	PG	PEG	BG	PG	PEG
1	17900	18500	5690	17900	18500	5690	17900	18500	5690
9	16900	16600	3580	15900	14600	1660	3840	3540	<2000
22	16300	17600	3370	15200	12600	2930	<2000	4410	<2000

## 实施例 2

### 稳定组合物中蛋白酶的重新激活

#### 材料

来自液化淀粉杆菌的非标准化的中性蛋白酶购自 Gist - bro-cades Séclin (France)。

#### 稳定的酶的配方

	重量(g)	最终浓度
水	24.25	48.5%
中性蛋白酶	25mg	
丙二醇	25.0	50%
羟丙基织物质素	0.75	1.5%
(klucel H 型, 来自 Hercules)		

制备: 在将增粘剂羟丙基织物质素与丙二醇混合后, 加入溶有酶的水并混合过夜。

#### 水溶液配方

	重量(g)	最终浓度
水	48.5	97%
羟丙基织物质素	0.75	1.5%
丙二醇	1.0	2%

制备: 将羟丙基织物质素与丙二醇混合, 随后加入水并混合过夜。

将一定量的稳定蛋白酶组合物(纯的或用含水组合物稀释的)在

Agfapan 25 薄膜板上点样。如果酶是有活力的,薄膜板上的明胶将被蛋白水解,留下一个或多或少的透明斑。该检测方法模拟了蛋白酶在体内降解角蛋白的粗糙表面的能力。

在将纯的稳定蛋白酶组合物点到薄膜板上后,没有观察到透明斑,这说明由于高的多元醇浓度,蛋白酶没有活力。用上述含水组合物以 1:1 和 1:2 的比例稀释稳定的蛋白酶组合物,所得到的丙二醇浓度分别为 26% 和 18%,这导致了透明斑的直径随稀释率的增加而增加,这表明蛋白酶被重新激活(参见图 1)。尽管 1:1 的稀释率已经导致了蛋白酶的部分激活,但这时的多元醇浓度对于局部应用来说还是高得不能接受。

一种非稳定的酶制剂,即没有丙二醇的酶制剂,在大约一周内都不显示活性。

因此,根据本发明稳定的酶在通过用一种合适的组合物稀释以使其重新激活前,基本不具有活性。

### 实施例 3

#### 含有不同的 $\alpha$ -羟酸的组合物的蛋白水解活力

本实施例显示了在酸性条件以及在  $\alpha$ -羟酸(AHA's)存在的条件下许多蛋白水解酶的效力。在摄影明胶胶片上测定蛋白水解活力。

#### 所使用的酶和材料

来自地衣型芽孢杆菌的丝氨酸蛋白酶购自 Genencor International, Bruges, Belgium, 将其溶解于含有 35% (w/w) 的丁二醇、35% (w/w) 的甘油、0.1% (w/w) pH6.0 的  $\text{Ca}(\text{Ac})_2$  以及水的混合物中。将溶液中的酶活力调节至在 37°C、pH7.0 下可获得大约 500 中性蛋白酶单位的活力(参见实施例 1)。

来自 *Rhizomucor miehei* 的天冬氨酸蛋白酶液体(210,000 凝乳单位/ml)购自 Gist-brocades, Séclin, France。

来自番木瓜的半胱氨酸蛋白酶粉末(六千万木瓜酶单位/克,根据 Food Chemical Codex III 测定)购自 Gist-brocades, Séclin, France。在使用前先配制新鲜的半胱氨酸蛋白酶溶液,方法是将

20mg 的酶粉末溶于 2ml 的软水中。

根据下面的标准制备 AHA 储备液。将 5 克的 1-乳酸 (Boom Chemie, Netherlands) 和 5 克的乙醇酸 (Merck, Germany) 分别溶于 80ml 的水中, 用 25% 的 NaOH 将 pH 调节至 4.0, 然后将水加至 100ml 以分别得到 5% 的 1-乳酸和乙醇酸溶液。将 5 克的水杨酸 (Acros, Belgium) 溶于 80ml 的水中并用 25% 的 NaOH 将 pH 调节至 4.4 (在 pH4.0 下不可能溶解), 然后将水加至 100ml 以得到 5% 的水杨酸溶液。

pH7.0 的磷酸缓冲液和 pH4.0 的柠檬酸 HCl 缓冲液购自 Merck, Germany。

### 实验

准备好分别含有 0.1 克丝氨酸蛋白酶溶液的五个玻璃小瓶、分别含有 0.1 克天冬氨酸蛋白酶的五个玻璃小瓶以及分别含有 0.1 克半胱氨酸蛋白酶溶液的五个玻璃小瓶。

向每一组的五个小瓶中分别加入 0.9ml 的 pH7.0 的缓冲液、pH4.0 的缓冲液、5% 的 1-乳酸、5% 的乙醇酸以及 5% 的水杨酸。在将酶与缓冲液或酸混合后, 分别将十五种溶液的 40 微升样品加在 Agfapan APX100 照相胶片的基质上。然后将有样品的胶片在一个潮湿的和有盖的培养皿中在 37°C 下保温 1 小时。保温结束后用自来水充分冲洗照相胶片并使其干燥。明胶层的去除被用来作为蛋白水解活力的量度。

由所得结果 (参见图 2) 可知, 不管各种 AHA's 存在与否, 丝氨酸蛋白酶似乎只在 pH7.0 左右时有活力, 而在 pH4.0 左右时无活力。

而在水杨酸的存在下, 天冬氨酸蛋白酶在 pH7.0 或 pH4.4 时都没有活力, 不管 5% 的 1-乳酸或 5% 的乙醇酸存在与否, 在 pH4.0 下酶有充分的活力。

在 1-乳酸、乙醇酸或水杨酸的存在下, 半胱氨酸蛋白酶在 pH7.0 以及更低 pH 值下具有活力。令人惊奇的是, 不管缺少哪一种 AHA's, 在 pH4.0 下都有极低的蛋白水解活力。

### 结论

- 在低 pH 值和 AHA's 存在下, 天冬氨酸蛋白酶优于丝氨酸蛋白酶。
- 在中性和酸性 pH 值下来自番木瓜的半胱氨酸蛋白酶都显示出蛋白水解活力。
- 根据条件应该选择最合适的蛋白水解酶。

#### 实施例 4

##### 磷酸抗坏血酸的酶活化

在 70% 的丙二醇中加入三种不同的具有文献记录的磷酸酯酶活力的酶, 在不同的条件下与磷酸抗坏血酸镁一同保温。使用 600MHz 的质子核磁共振来计量磷酸抗坏血酸镁的脱磷酸作用。

##### 酶

肌醇六磷酸酶[黑曲霉(*Aspergillus niger*); 不含甘油, 含有大约 12.000FTU/克]以及酸性磷酸酶(黑曲霉; 冻干的粉末, 含有大约 10.000 单位/克)购自 Gist-brocades, Delft, the Netherlands。

马铃薯磷酸酶(冻干的粉末)购自 Sigma。

##### 实验

在 D<sub>2</sub>O 中含有 70% (w/w) 的丙二醇和 2mmol/l 的 EDTA (pH7-8) 的液体中分别溶解大约 1% (w/w) 的上述每种酶制剂。

将这些在 D<sub>2</sub>O 中含有 1% (w/w) 的磷酸抗坏血酸镁 (NIKKO Chemicals Co, Japan) 的酶储备液稀释十倍, 用乙酸将 pH 缓冲至 5.0 并保存在 37℃ 下, 在 4 小时内导致了 50% 的磷酸抗坏血酸镁的降解。

将含有 70% 丙二醇的酶储备液在 37℃ 下存储 1 周, 在本检测中这不会明显地影响酶活力。

在 70% (w/w) 的丙二醇的存在下, 酶与底物的组合明显地显示出在这些条件下酶不具有活性。从在 D<sub>2</sub>O 中含有 5% (w/w) 的磷酸抗坏血酸镁的储备液开始, 所制备的混合物含有:

- 70% (w/w) 丙二醇
- 1% (w/w) 磷酸抗坏血酸镁
- 2mmol/l EDTA

——pH7-7.5

在完全溶解后(其间形成了一种凝胶状结构),加入1%(w/w)(预溶解的)酸性磷酸酶和马铃薯磷酸酶。将所得到的混合物在37℃下保温1周,然后以不含酶的相似样品为对照,测定水解的磷酸抗坏血酸镁的浓度。

由于检测不到酶水解,这又一次显示了在高浓度多元醇的存在下酶活力的缺乏。

#### 实施例5

在应用条件下肌醇六磷酸酶水解磷酸抗坏血酸镁的性能

已知在应用条件下肌醇六磷酸酶(NatuPhos<sup>®</sup>5000L, Gist-brocades, Delft, the Netherlands)是有效的。在测试中,将2ml在pH6.0的100mM的醋酸钠中1%的磷酸抗坏血酸镁与200 $\mu$ l的酶溶液混合。通过将NatuPhos<sup>®</sup>5000L在一种含有70%甘油的溶液中稀释5倍来获得酶溶液(用以获得377U/g的磷酸抗坏血酸镁;1U就是在pH6.0和30℃下,每分钟从1%磷酸维生素C中释放1 $\mu$ mol磷酸的酶量)。在经过不同的保温时间后,通过加入1ml 20%的TCA来终止反应。

通过使用<sup>31</sup>P-NMR测定磷酸浓度来跟踪磷酸抗坏血酸镁的转化。可以看到在30℃下在30分钟内就可获得85%的磷酸抗坏血酸镁的转化率。在37℃下,在相同的时间内获得了89%的转化率。保温60分钟后,产率上升至大约90%。在30分钟内进行完全转化所需的最小活力是122U/g磷酸维生素C。

#### 实施例6

酶促生成过氧化氢

将含有低浓度的过氧化氢酶的乙醇氧化酶(Hansenula SP., 来自Sigma)粉末溶于水中,然后加入甘油,使甘油的最终浓度为60%(w/w)。将这种稳定的酶溶液在室温下存储1个月后,在含有2%乙醇和0.01M磷酸、pH7的水溶液中将该酶溶液稀释10倍。过氧化氢的生成是通过将Perid试验片条(Boehringer Mannheim, Germany)浸入乙醇水溶液中所形成的蓝绿色来显示的。这样产生的



过氧化氢可随后被用作过氧化氢酶的底物。

通过使存在于一个容器中的过氧化氢产生酶和合适的过氧化物酶[例如在一种稳定液中的乳过氧化物酶(Sigma)]与存在于另一个容器中的所需的酶前体相结合,根据本发明的方法混合两个容器中的内容物,就得到了有活性的杀生物化合物。

### 实施例 7

#### 乙酸维生素 A 的脱乙酰作用

#### 酶

Piccantase 浓缩液(Rhizomucor miehei, 含有大约 30.000 BGLE/g)自 Gist-brocades, Seclin, France)。

纯 Maxatase [枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 含有大约 2.16BYU/kg)来自 Genencor International B. V., Delft, Netherlands。

G999 磷酸酶 L(黑曲霉, 含有大约 1000u/g)来自 Enzyme Bio-Systems Ltd., Englewood Cliffs, NJ, U.S.A.。

木聚糖乙酰酯酶(黑曲霉转化体 TrA10, 描述于 EP0507369 中, 通过保藏的微生物获得)。在接种后, 转化体 TrA10 在每升含有 30 克大豆浆的培养基中生长以引入酶活力。在最低 pH4.0、30℃ 下通风生长 48 小时后, 将发酵液离心并过滤上清液。第一次过滤在 Seitz K700 过滤器上进行, 第二次过滤在 Seitz Supra 250 过滤器上进行, 细菌过滤在 Seitz Supra EKS 进行。通过超滤使得到的液体浓缩 10 倍, 然后将浓缩液冻干。在最终的粉末中木聚糖乙酰酯酶的活力被估计为大约 300 单位/克粉末。

#### 乙酸视黄醇水解

通过将 6 毫克的酶粉末(即 Piccantase、Maxatase 和木聚糖乙酰酯酶)溶于 1 毫升的软水中制得酶溶液。将 16 微升的液体 G999 制剂稀释于 1 毫升的软水中。通过将 55 毫克的乙酸视黄醇溶于 1 毫升的甲醇中制得乙酸视黄醇(Sigma)的储备液。

通过将 100 微升 pH5.5 的磷酸缓冲液、100 微升酶溶液以及 200 微升乙酸视黄醇储备液加入到 500 微升的软水中对酶进行培养。混合后, 将各种溶液在氩气中在 37℃ 下保温 1 或 4 小时。随后

将溶液冻干并加入氘化氯仿(Merck, Germany)。使用 600MHz 的质子核磁共振来测量乙酸视黄醇中被除去的乙酸部分。

酶	乙酸视黄醇的水解	
	1 小时后	4 小时后
Maxatase	—	—
G999	—	+
木聚糖乙酰酯酶	0	++
Piccantase	+	++

— = 无水解; 0 = 可检测到的水解;

+ = 明显的水解; ++ = 完全的水解

#### 脂类水解

在一些酯化维生素的使用中,用具有分解脂肪活力的酶重新活化维生素是不够理想的。例如在重新活化包含于化妆品中的维生素前体时,应该避免包含于化妆品中的油脂的酶促降解。因此使用对甘油三酯无降解作用的维生素活化酶将是有利的。为了确定上述的乙酸视黄醇降解酶的甘油三酯降解效果,对三种活性酶进行测试,其中计量了乳化橄榄油的水解。

制备了一种橄榄油在聚乙烯醇和水中的乳化液。不存在大于 10 微米的油滴。在加入酶溶液后,由于脂肪酸的酶促释放而产生的 pH 降低用不断滴入氢氧化钠来补偿。在 pH7.5 和 37℃ 下经过一段固定的保温时间后,计量所使用的氢氧化钠的总量并将其作为解脂活力的(相对)值。该方法的详细内容描述于文献 CQA4047 中,而且可要求 Gist-brocades, Seclin, France 提供。

酶	分解脂肪活力/克酶
G999	<1
木聚糖乙酰酯酶	110
Piccantase 浓缩液	20.000

### 结论

- 包括脂酶的多种酶可以使乙酸维生素 A 脱乙酰化。
- G999 和木聚糖乙酰酯酶都是十分令人感兴趣的,因为这些酶将脱乙酰活力与非常低的解脂活力结合起来。另外,这些酶的天然底物(例如溶血磷脂和乙酰化的木聚糖)通常不存在于人皮肤中。

### 实施例 8

#### 晶体蛋白酶的悬浮液

在多组分的配制系统中,适当地悬浮固定化和稳定化的物质对于保证将活性物质均匀地配入最终组合物中是重要的。悬浮方法应该能够使固定化的活性物质长期保存而不沉淀。

#### 材料

ChiroCLEC-BL, 交联的蛋白酶(枯草溶菌素)晶体的水溶液, 得自 Altrus Biologics Inc., Cambridge, MA, USA。

Carbopol - Ultrez - 10, 一种增粘聚合物, 得自 BF Goodrich, The Hague, Netherlands。

从 ChiroCLEC-BL 的均匀含水悬浮液中取出 4.8 克样品并离心以收集晶体物质。将上清液除去后, 将晶体在无离子水中清洗一次并再次离心, 然后将该晶体悬浮于最终的量为 10 克的含有 35% 甘油、35% 丁二醇和 0.4% Carbopol 的组合物中。使用三乙醇胺将所得悬浮液的 pH 调节至 5.5。

在经过充分均质化后, 将悬浮液放置于 40℃ 下。在这个温度下保温一个月后, 没有观察到晶体的沉淀。对酶悬浮液的最终的稀释

能够恢复酶的活力。

### 实施例 9

#### 二羟基丙酮的稳定

使用不同的抗氧化添加剂以及在不同的温度和 pH 值下分析 DHA 溶液的稳定性。

#### NMR 分析

DHA 降解产物的鉴别以及定量化在一台 Bruker AMX-600 光谱仪上进行, 在 600MHz 的  $^1\text{H}$  频率下操作。使用一个 5mm 的反向探针。巨大的水信号通过简单预饱和方法 (2S) 或使用组合脉冲 (2S) 的预饱和方法消除。2 秒的延迟使得被观察的脉冲之间不能充分地舒张, 因此计量结果应被认为是半计量性的, 即可能产生一个达 100% 的系统误差。然而一组内的测量结果可被用于有意义的比较。

#### HPLC 分析

用 HPLC 方法对一些样品进行分析。向每种为 2ml 的样品中分别加入 400 $\mu\text{l}$  20% 的高氯酸。使用了下述装备和条件:

HPLC 泵	Varian LC 5010
注射体积	20 $\mu\text{l}$
检测器	IOTA 差动式折射计
	Varian UV-5, 215nm
柱	Aminex Hpx 87H 300 $\times$ 7.8mm
洗脱液	0.01N $\text{H}_2\text{SO}_4$
流量	0.6ml/min

该方法只用于计量第一组实验中的 DHA。

#### 在 50 $^\circ\text{C}$ 的水中 DHA 的降解

在 0.1M 磷酸 (pH7) 缓冲液中或 0.1M 焦磷酸 (pH5.5 和 pH8.5) 的  $\text{D}_2\text{O}$  溶液中制备 5% 的 DHA 溶液。在一些情况下加入抗坏血酸。将样品在一个 50 $^\circ\text{C}$  的炉子中保温 7 天以上。

50 $^\circ\text{C}$  水中 DHA 的降解, 样品条件和 2、5、7 天后的剩余 DHA:

pH	抗坏血酸 g/l	保温下列天数后的 DHA(g/l)				最终 pH
		0	2	5	7	
5.5	—	49	31	22	17	4.9
7.0	—	49	18	13	11	5.6
8.5	—	46	2.4	1.1	0.8	7.5
7.0	9	48	18	13	11	5.7
5.7	9	47	28	19	14	5.3

### 结论

——酸性 pH 条件促进 DHA 的存储稳定性。

——诸如抗坏血酸的还原剂的存在对 DHA 的存储稳定性没有明显的影响。

### 在不同条件下 DHA 在 40℃ 下的降解

在 0.2M 的焦磷酸缓冲溶液中制备 5% 的 DHA 溶液。向所有的样品中加入 10% 的 D<sub>2</sub>O, 其中含有叔丁醇, 它作为一种内标物。叔丁醇的最终浓度为 0.45mg/ml。在 H<sub>2</sub>O/乙二醇 = 1/1 的混合物中制备 4 号和 5 号样品。另外, 向上述样品中加入 10% 的叔丁醇, 而在样品 5 中还加入 15mg(dl)α-生育酚。用氮气或空气将样品冲洗 30 分钟。这些条件也在下面加以汇总。将样品在 40℃ 下保温 35 天。

样品组成和处理:

样品编号	DHA	pH	冲洗	添加
1	5	6	空气	—
2	5	6	N <sub>2</sub>	—
3	5	5	空气	—
4	5	5	N <sub>2</sub>	乙二醇/H <sub>2</sub> O/叔丁醇 45/45/10 见 4 + 0.3 生育酚
5	5	5	N <sub>2</sub>	
6	5	2.6	空气	—

在 40℃ 下 35 天后的 DHA 降解

样品编号	剩余 DHA 初始 = 100 %	所形成的甲 酸 ppm	所形成的 乙酸 ppm
1	20 %	1600	2400
2	20 %	1400	2600
3	40 %	1000	1200
4	30 %	nd	nd
5	30 %	nd	nd
6	90 %	200	300

na = 未测定

结论: 未确定

——只有将 pH 值调至很低后才能得到明显的 DHA 稳定性。

#### 实施例 10

##### 香波中的那他霉素

在本实施例中描述了对一种配制系统的使用, 设计该系统是为了以 1:10 的比率同时输送含有那他霉素的组合物和一种香波组合物。

将 11g 三水合那他霉素、1g 合成生物聚合胶 (Keltrol<sup>®</sup> RD, Kelco International Limited)、8g 乳糖、0.5g 柠檬酸以及 0.055g 二水合柠檬酸钠在一台 Turbula<sup>®</sup> 混合器中混合。然后将全部混合物悬浮于 480ml 的水中。所得到的悬浮液 pH 为 4.8, 含有 2% 的纯那他霉素。

将 25ml 的上述悬浮液放入配制器的一个小室中, 而在另一个小室中充有 225ml 的香波组合物。

在使用时得到了一种含有 2000ppm 那他霉素的香波。

#### 实施例 11

##### 用于发癣菌病的那他霉素

将 110g 三水合那他霉素与 1g 生物合成聚合胶悬浮于 388ml 的蒸馏水中,然后通过加热处理灭菌。悬浮液的 pH 为 6.5。放置至少 4 周后没有观察到沉淀。HPLC 分析显示在刚制备完和在室温下存储 4 周后那他霉素的含量分别为 20.1 和 20.2% (w/w)。

将 200g 一水柠檬酸和 4g 生物合成聚合胶溶于 876ml 的蒸馏水中并通过热处理灭菌。溶液的 pH 为 3.0。

通过使用一种配制系统(该系统的设计目的是以 1:9 的比率同时输送那他霉素组合物和柠檬酸溶液),每一剂量都含有大约 2% 的那他霉素。为获得用于处理动物的含有 200 或 100ppm 那他霉素的溶液,可以通过与水混合将剂量简单地稀释 100 至 200 倍。这样含有 250g 样品(25g 那他霉素悬浮液和 225g 柠檬酸溶液)的配制器将足以生产总量为 25 至 50 升的处理溶液。

通过使用能够同时输送稳定的含有那他霉素的悬浮液和柠檬酸组合物的配制系统(两种组合物被分隔盛放),就得到了一种能够经济地制备小剂量的系统。

### 实施例 12

#### 配制系统

适合于同时配制两种分开盛放的不相容化合物的配制系统是众所周知的。因此大略描画于图 3 中的配制系统只是众多产品中的一个例子,这些产品的范围从微小的、两室的单一用途的袋到使用不同产品的小室的管或使用可挤压的、粘性的和相对惰性的物质以分离不相容化合物的分隔成小室的管。

示于图 3 中的配制器能够通过挤压配制头 C 来同时配制分别存储于 A 和 B 中的两种化合物。挤压配制头 C 激活了两台小泵,它们随后以大约相同的量配制两种化合物。根据所设计的配制头,化合物可以在两股分开的物流中配制或只在一股物流中配制。

根据本发明,需要一个配制单元,它可以以例如 1:2 的比率同时输送一种稳定的含水酶组合物与一种不含酶的基础组合物。

换成描画于图 2 中的配制器,这将意味着在只挤压配制头一下时两个泵中的一个能够以另一个泵的至少两倍的量进行配制。

换成一个两室的单一用途的袋子,这将意味着含有酶组合物的小室至少可以容纳另一个小室可以容纳的体积的一半。

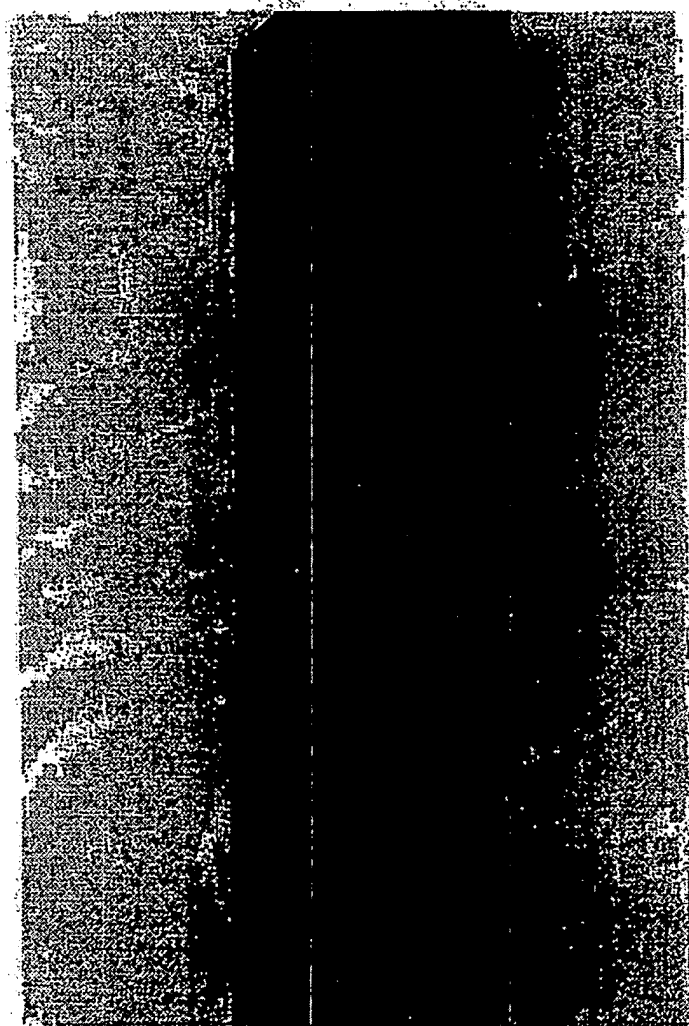
换成一个两室的管,这将意味着在相同的压力下,包含不含酶组合物的小室的排出口允许至少两倍于另一个小室的排出口所允许的通量。

换成用可挤出材料分隔成小室的管,这将意味着在管内的不含酶的组合物至少两倍于含酶产品的体积。



# 说明书附图

---



纯的

1:1 稀释的

1:2 稀释的

图 1

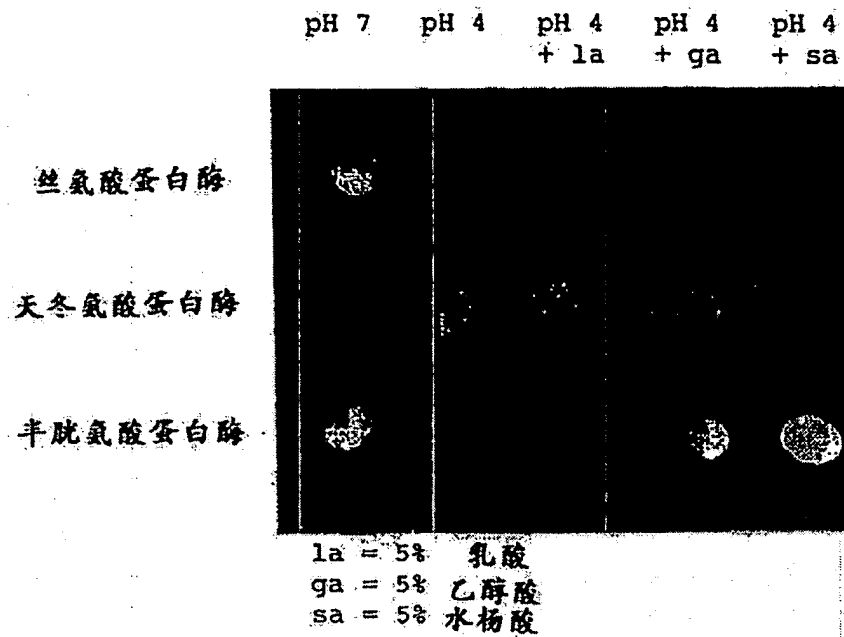


图 2

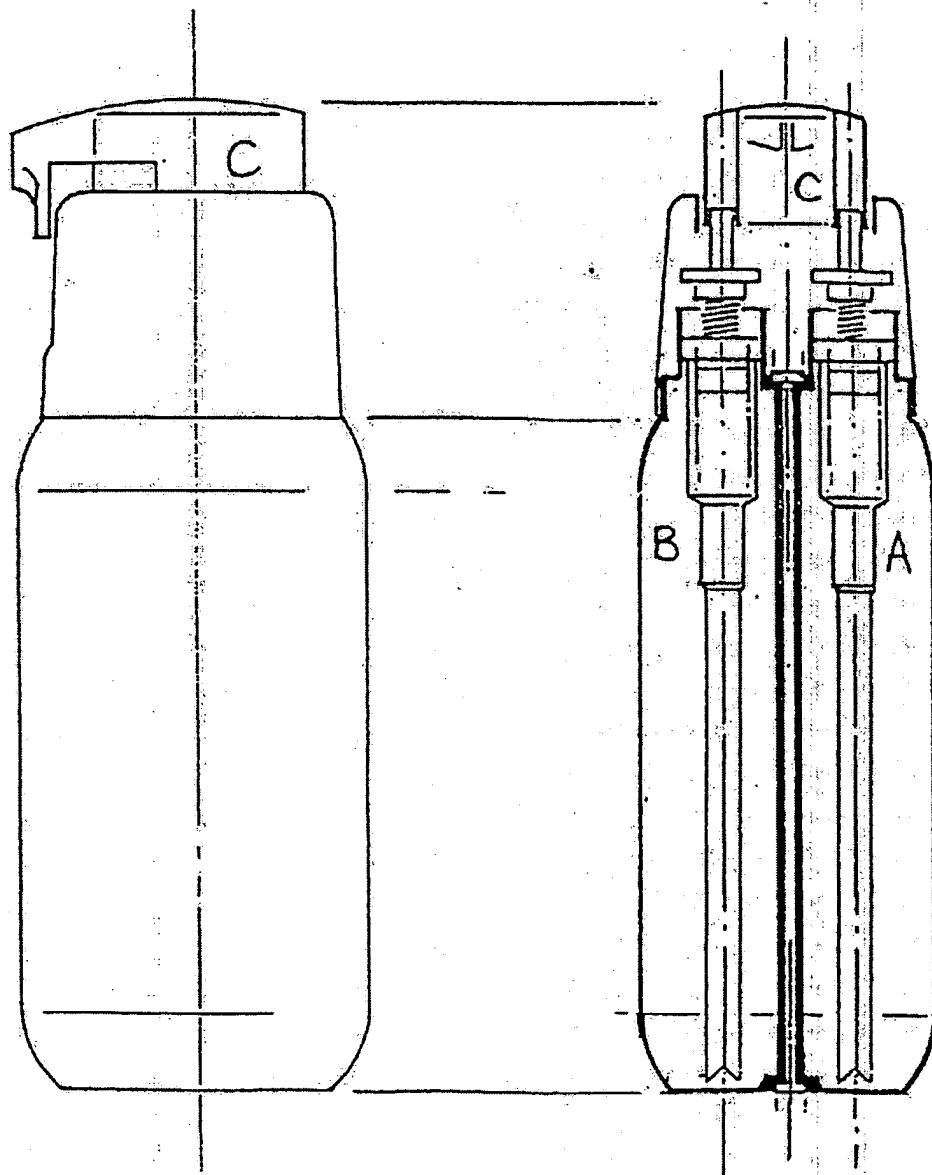


图 3